TOYO INK

リン酸化タンパク質染色用キット

PhosphoQUANTI SolidBlue GelDye Kit

取扱説明書

目次

東洋ビーネット株式会社

2006. 12.

Ⅰ．本試薬の概要

翻訳後修飾反応の一種であるタンパク質のリン酸化反応は、細胞内シグナル伝達において重要な役割をはたしています。そのため、タンパク質やペプチドに対するリン酸化反応の過程を解析する技術が不可欠です。これまでに、リン酸化タンパク質の検出には、放射性同位体である ^{32}P を用い、オートラジオグラフィーで検出する方法が開発されました。この方法はリン酸化タンパク質を高感度で検出することが可能ですが、生体試料の利用に制限があります。また、放射性同位体元素が細胞内に取り込まれることにより DNA のフラグメント化やアポトーシスが誘発されることなどが報告されています。他方で、抗リン酸化タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法は、非 RI の検出系であるため実験を行う上で安全性が高くなります。しかしながら、抗リン酸化チロシン抗体は特異性が高くその利用価値は高く評価されていますが、リン酸化セリン･スレオニン認識抗体はその特異性が低く、包括的なリン酸化タンパク質の検出には不向きです。

このたび弊社は、京都大学大学院　工学研究科　濵地教授と共同し、簡便な実験操作により、全ての種類のリン酸化アミノ酸（セリン･スレオニン･チロシン）を検出するシステムを開発しました。

本製品には以下の特徴があります。

1．生理的条件下において、セリン／スレオニン、チロシンすべてのリン酸化タンパク質･ペプチドを高感度で検出可能

本キットで使用している蛍光センサーは、リン酸化アミノ酸の種を問わずリン酸化アミノ酸と強い親和性があります。（図 1）。さらに、リン酸化ペプチドに対しては 1 μM から定量が可能です（図 2）。

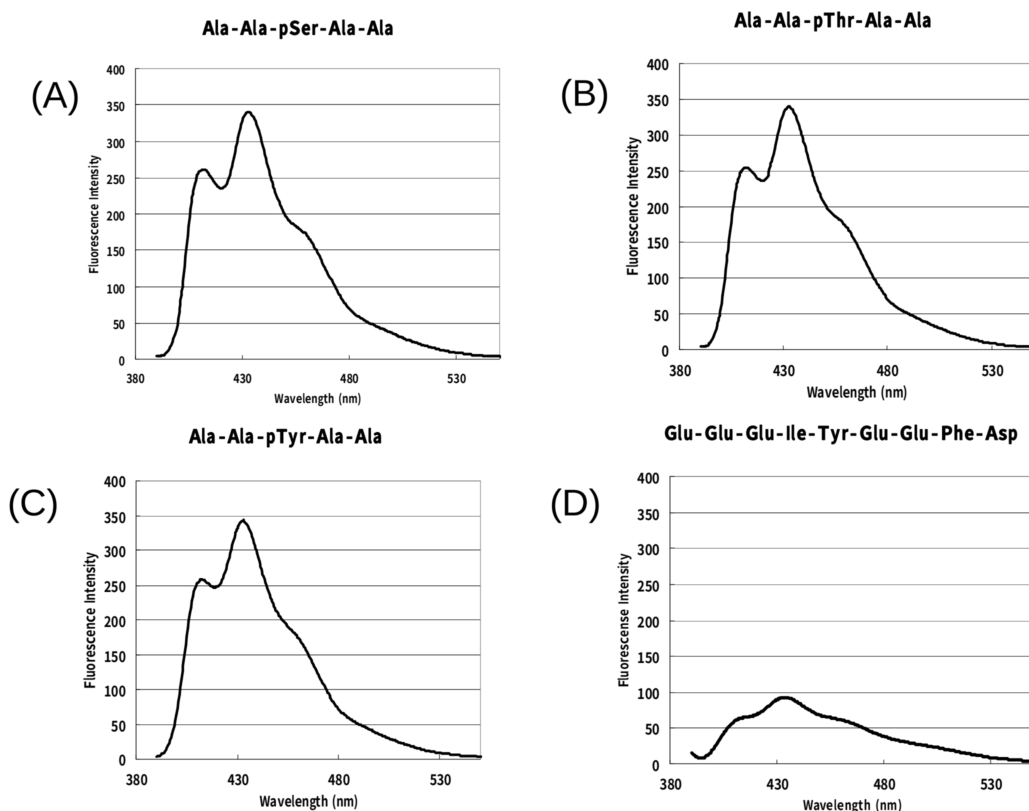


図1．リン酸化アミノ酸含有ペプチドおよび非リン酸化アミノ酸ペプチドの蛍光滴定試験。
生理的条件下（50 mM HEPES pH 7.2）において、PhosphoQUANTI SolidBlue に対しリン酸化アミノ酸含有ペプチドまたはリン酸化アミノ酸非含有ペプチドを滴下した際の蛍光スペクトル変化。A）リン酸化セリン含有ペプチドを滴下した場合の蛍光スペクトル　B）リン酸化スレオニン含有ペプチドを滴下した場合の蛍光スペクトル　C）リン酸化チロシンを滴下した場合の蛍光スペクトル　D）リン酸化アミノ酸非含有ペプチドを滴下した場合の蛍光スペクトル。　励起波長はいずれも 380 nm。
データご提供：京都大学大学院　工学研究科　濵地研究室　王子田先生

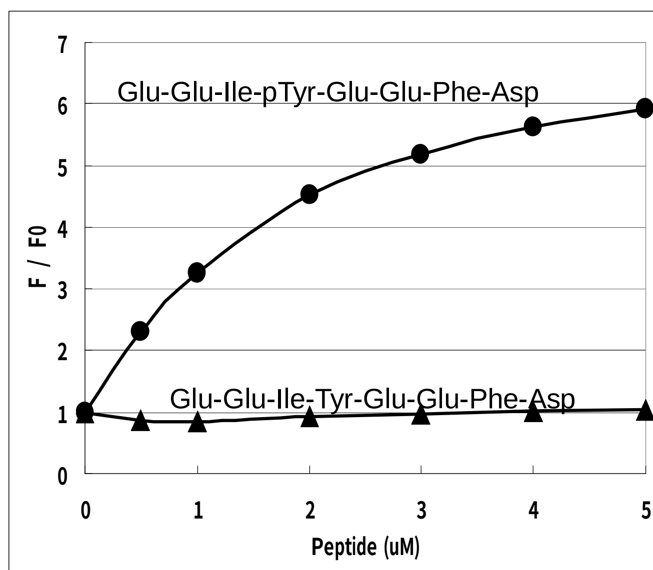


図.2 PhosphoQUANTI SolidBlue とリン酸化アミノ酸含有ペプチド (●) および非含有ペプチド (▲) との滴定曲線。リン酸化ペプチドにおいては 1μM から検出可能であることが示された。
データご提供：京都大学大学院　工学研究科　濵地研究室　王子田先生

2．簡単な実験操作

従来の抗体を用いたウエスタンブロット法と比較して、リン酸化タンパク質の検出までの時間を大幅に低減します。また、実験操作も CBB 染色と変わりなく、簡単です。

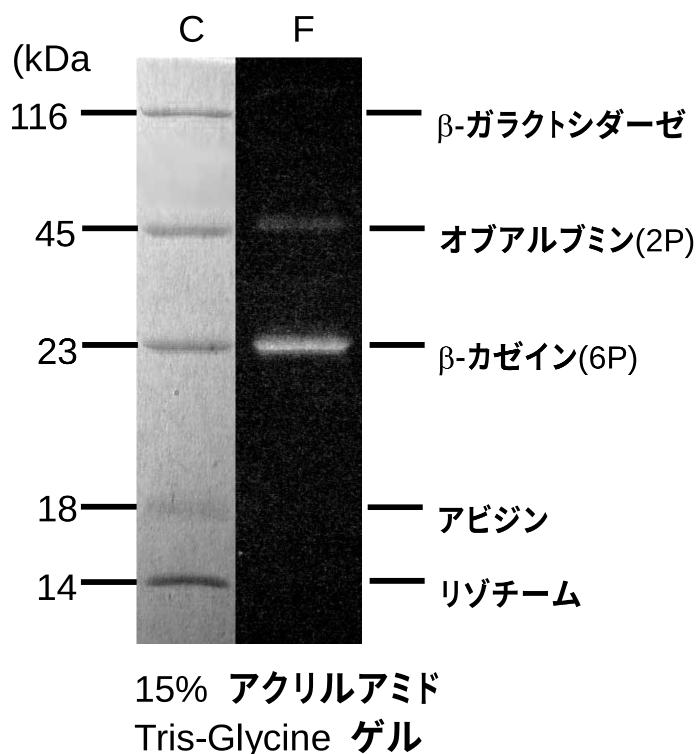


図 3．各タンパク質の CBB 染色像 (C) および Phospho QUANTI SolidBlue GelDye Kit を用いた蛍光染色像(F)。オブアルブミン (リン酸化アミノ酸残基数 2) とβ-カゼイン (リン酸化アミノ酸残基数 6) が特異的に蛍光染色されていることが確認できる。

II． 製品構成

製品名	コード No.	構成		保存条件
Phospho QUANTI SolidBlue GelDye Kit (ミニゲル 20 枚染色用)	PQ-SB22	染色試薬	400 mL × 1本	冷蔵 (遮光)
		洗浄試薬	100 mL× 2 本 (10 倍濃縮液)	冷蔵

III． 保存方法

1．本試薬は冷蔵保存です。染色試薬は暗所に保存してください。
2．製品に記載された使用期限内に使用してください。

Ⅳ． ゲル染色プロトコール

A) 試薬の調製

本製品の洗浄試薬は 10 倍濃縮で供給されています。ご使用前に純水 (MiliQ 水を推奨) で希釈してください。希釈した洗浄試薬は調製後すみやかにご使用ください。なお、洗浄試薬は別売も行っております。「X．関連製品」をご参照ください。

染色試薬および洗浄試薬はご使用前に室温に戻してください。

ゲル固定液は、10%酢酸・40%メタノールからなる溶液をご使用ください。

B) サンプルの調製と電気泳動

Phospho QUANTI SolidBlue GelDye Kit で染色するタンパク質サンプルに、過剰な塩・界面活性剤・還元剤が含まれていますとバックグラウンドや染色されない原因となることがあります。これらが含まれないよう、サンプルの前処理を行ってください。

電気泳動は、標準的な SDS-PAGE で行ってください。ゲル作製法やパワーサプライの取扱は、各メーカーの取扱説明書をご参照下さい。

非リン酸化タンパク質の存在を確認するため、デュプリケートゲルを作製して、CBB 染色または銀染色を行うことを推奨します。

C－1) リン酸化タンパク質の蛍光染色 (標準プロトコル)

1．ゲルをガラス板から取りはずす。
2．ゲル固定液 (50 ml) にゲルを浸し、30 分間ゆっくり振とうする。
3．純水 (50 ml) にゲルを移し、10 分間振とうする。3回繰り返す。
4．リン酸化タンパク質染色試薬 (20 ml) にゲルを移し、遮光しながら 30 分間ゆっくり振とうする。
5．専用洗浄試薬 (50 ml) にゲルを移し、遮光しながら 30 分間振とうする。
6．純水にゲルを移し、遮光しながら 10 分間振とうする。

C－2) リン酸化タンパク質の蛍光染色 (迅速化プロトコル)

1．ゲルをガラス板から取りはずす。
2．ゲル固定液 (50 ml) にゲルを浸し、30 分間ゆっくり振とうする。
3．純水 (50 ml) にゲルを移し、10 分間振とうする。3回繰り返す。
4．リン酸化タンパク質染色試薬 (20 ml) にゲルを移す。
5．電子レンジ (出力 150 W) でリン酸化タンパク質染色試薬が沸騰するまで加熱する。
6．遮光しながら 10 分間ゆっくり振とうする。
7．専用洗浄試薬 (50 ml) にゲルを移す。
8．電子レンジ (出力 150 W) で洗浄試薬が沸騰するまで加熱する。
9．遮光しながら 10 分間振とうする。
10．純水にゲルを移し、遮光しながら 10 分間振とうする。

D) ゲルのイメージング

リン酸化タンパク質の蛍光による検出は、ゲルイメージャーもしくは UV トランスイルミネーターを使用することができます。本キットに含まれているリン酸化部位検出用蛍光センサーは、励起波長 380 nm、蛍光波長 440 nm です。ゲル

イメージャーを使用する場合は、該当波長に近い光源とフィルターを使用してください。UV トランスイルミネーターを使用した場合、ゲルイメージャーより感度が約一桁低下します。光源は 360 nm を使用してください。

V. トラブルシューティング

問題	原因	解決法
リン酸化タンパク質の蛍光強度が弱い。	1) 洗浄不足によるバックグラウンドの蛍光。 2) 励起波長、蛍光波長が異なっている。 3) 染色試薬の使用期限が過ぎている。	1) 純水での洗浄時間を延長してください。 2) 本試薬で使用している蛍光センサーの励起波長・蛍光波長に適合しているかを再度確認してください。 3) 使用期限内の試薬を使用してください。
斑点・線状の蛍光が観察される。	1) ゲルまたは泳動バッファーへのタンパク質や蛍光物質の混入。 2) ゲルを素手で扱い、手あかなどが付着。	1) ゲル作製用試薬または泳動バッファーに異物が混入しないよう注意してください。また、使用する水はオートクレーブしたものを用いることをお勧めします。 2) ゲルを扱う際は、なるべくヘラ等をご使用下さい。直接手で扱う場合は必ずラテックス手袋を装着してください。
染色されていない	1) SDS が十分ゲルから除去できていない。 2) 固定液（メタノール・酢酸）が十分ゲルから除去できていない。	1) ゲルの固定処理を十分行ってください。 2) ゲル固定後、純水での洗浄操作を十分に行ってください。
非リン酸化タンパク質も染色されている。	洗浄試薬での蛍光センサーの洗浄不足。	洗浄試薬でゲルを洗浄する時間を延長してください。それでも解決されない場合は、洗浄試薬を電子レンジで1秒間煮沸し、10 分程度振とうして下さい。

VI. 関連製品

製品名	コード No.	構成		保存条件
Phospho QUANTI SolidBlue GelDye washing reagent	PQ-SB33	洗浄試薬	100 mL (10 倍濃縮液)	冷蔵
Phospho QUANTI SolidBlue Complex	PQ-SB11		10 mg	冷凍

Ⅶ. 安全上のご注意

- 本製品を研究用途以外には使用しないでください。
- 本製品の廃棄は、焼却廃棄するか、または専門の廃棄物処理業者に委託して行ってください。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ずおのおのの使用説明書をよく読み、その指示に従って調製・準備を行ってください。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合がありますので、試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄してください。

Ⅷ. 使用方法のご注意

- 製品の安全性についてのご質問は、下記問い合わせ先にご連絡ください。
- 本製品を火気に近づけないでください。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けてください。
- 手袋・保護用メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けてください。万一、試薬類が目に入ったり、皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けてください。
- 使用期限と保存条件を厳守してください。
- その他、ご不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

= お問い合わせ先（9:00～17:30）=
東洋ビーネット(株) バイオプロダクツ部
〒104-0031 東京都中央区京橋 2-3-13
TEL: 03-3292-1954
FAX: 03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: http://www.toyo-b-net.co.jp/

Ⅸ. 保証について

製造元では、本製品に不具合があった場合、代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な、もしくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任を負いません。

Ⅹ. ライセンスに関する注意事項

本製品で用いているリン酸化タンパク質染色分子は、国立大学法人 京都大学 濵地教授が特許出願されています。東洋ビーネット(株)は、濵地教授から、技術指導を受けるとともに、その特許の許諾先である JST（科学技術振興機構）から製造・販売の許諾を受けております。